



食 品 快 速 检 测 方 法

KJ 202209

蔬菜水果中腐霉利的快速检测 胶体金免疫层析法

2022-12-05 发布

国家市场监督管理总局 发 布

蔬菜水果中腐霉利的快速检测
胶体金免疫层析法

1 范围

本方法规定了蔬菜水果中腐霉利的胶体金免疫层析快速检测方法。
本方法适用于韭菜、番茄、黄瓜、茄子、葡萄、草莓等蔬菜水果中腐霉利的快速测定。

2 原理

本方法采用竞争抑制免疫层析原理。样品中腐霉利经提取后与胶体金标记的特异性抗体结合,抑制抗体和试纸条中检测线(T线)上抗原的结合,从而导致检测线颜色深浅的变化。通过检测线与控制线(C线)颜色深浅比较,对样品中腐霉利进行定性判定。

3 试剂与材料

除另有规定外,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的二级水。

3.1 试剂

- 3.1.1 丙酮(C₃H₆O)。
- 3.1.2 乙酸乙酯(C₄H₈O₂)。
- 3.1.3 乙腈(CH₃CN)。
- 3.1.4 甲醇(CH₃OH)。
- 3.1.5 三羟甲基氨基甲烷(C₄H₁₁NO₃),又名 Tris 碱。
- 3.1.6 盐酸(HCl,37%)。

3.2 试剂配制

- 3.2.1 Tris-盐酸缓冲液(pH=9.0,0.2 mol/L):称取 24.2 g Tris 碱(3.1.5)于 700 mL 水中,搅拌溶解后,加入盐酸(3.1.6)调节 pH 至 9.0,用水定容至 1 000 mL。
- 3.2.2 样品提取液:准确移取 10 mL 甲醇(3.1.4),用 Tris-盐酸缓冲溶液(3.2.1)稀释定容至 100 mL。

3.3 标准品

腐霉利标准品的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量见表 1,纯度≥99.0%。
注:或等同可溯源物质。

表 1 腐霉利标准品的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量

中文名称	英文名称	CAS 号	分子式	相对分子质量
腐霉利	Procymidone	32809-16-8	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	284.14

3.4 标准溶液配制

3.4.1 腐霉利标准储备液(1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$):准确称取 25 mg(精确至 0.1 mg)腐霉利标准品(3.3),置于 50 mL 烧杯中,用 5 mL 丙酮(3.1.1)溶解,全部转移至 25 mL 容量瓶中,再用少量丙酮多次洗涤烧杯转移至容量瓶中,最后用丙酮(3.1.1)定容,摇匀,配制成浓度为 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的腐霉利标准储备液,避光 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 1 年。

3.4.2 腐霉利标准中间液 A(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$):准确移取腐霉利标准储备液(3.4.1)5 mL 于 10 mL 容量瓶中,用乙酸乙酯(3.1.2)定容,摇匀,配制成浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的腐霉利标准中间液 A,避光 $0\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 1 个月。

3.4.3 腐霉利标准中间液 B(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$):准确移取腐霉利标准储备液(3.4.1)1 mL 于 10 mL 容量瓶中,用乙酸乙酯(3.1.2)定容,摇匀,配制成浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的腐霉利标准中间液 B,避光 $0\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 1 个月。

3.4.4 腐霉利标准工作液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$):准确移取腐霉利标准中间液 B(3.4.3)1 mL 于 10 mL 容量瓶中,用乙腈(3.1.3)定容,摇匀,配制成浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的腐霉利标准工作液,临用现配。

3.5 材料

腐霉利胶体金免疫层析试剂盒:含胶体金试纸条或检测卡及配套的试剂。

4 仪器和设备

4.1 电子天平:感量分别为 0.01 g 和 0.1 mg。

4.2 涡旋混合器。

4.3 组织捣碎机。

4.4 滤纸(滤速:快速,直径:12.5 cm)。

4.5 水浴锅或孵育器。

4.6 移液器:量程为 100 μL 、200 μL 、1 mL、10 mL。

4.7 计时器。

4.8 胶体金读数仪(可选)。

5 环境条件

温度 $15\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

6 分析步骤

6.1 试样制备

取样部位:韭菜取整株,黄瓜取全瓜(去柄),番茄、茄子、葡萄、草莓取全果(去柄)。

取具有代表性的样品约 200 g,充分捣碎混匀,分别装入洁净容器作为试样和留样,密封,标记。留样置于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 及以下保存。

6.2 试样提取

6.2.1 韭菜

准确称取试样 3 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 9 mL 样品提取液(3.2.2),涡旋振荡提

取 1 min,过滤得样品液,即为待测液。

6.2.2 番茄、黄瓜、茄子、葡萄、草莓

准确称取试样 3 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 9 mL 样品提取液(3.2.2),涡旋振荡提取 1 min,过滤得样品液 1。吸取 100 μ L 样品液 1 于 2 mL 离心管中,加入 900 μ L 样品提取液(3.2.2)混匀,即为样品液 2。不同基质样品液 2 按表 2 进行配制,即为待测液。

表 2 不同基质稀释比例

基质	样品液 2+样品提取液(3.2.2)
番茄、黄瓜	200 μ L 样品液 2+150 μ L 样品提取液
茄子、葡萄	100 μ L 样品液 2+350 μ L 样品提取液
草莓	100 μ L 样品液 2+800 μ L 样品提取液
注:表中数据为推荐的稀释比例,实际操作中可按照试剂盒说明书操作。	

6.3 测定步骤

测试前,将未开封的金标微孔和试纸条(3.5)恢复至室温。用移液器吸取 200 μ L 待测液于金标微孔中,反复抽吸 4 次~5 次,使微孔中试剂混合均匀,于 20 $^{\circ}$ C~30 $^{\circ}$ C 反应 3 min~5 min,将试纸条下端插入到金标微孔中,于 20 $^{\circ}$ C~30 $^{\circ}$ C 反应 8 min~9 min,从微孔中取出试纸条,去掉试纸条下端样品垫,在 1 min~3 min 内判读结果。

注:测定步骤建议按照试剂盒说明书进行。

6.4 质控试验

6.4.1 空白试验

称取同类基质空白试样,按照 6.2 和 6.3 步骤操作。

6.4.2 加标质控试验

6.4.2.1 韭菜

称取空白试样 3 g(精确至 0.01 g)置于 50 mL 离心管中,加入 60 μ L 腐霉利标准工作液(10 μ g/mL)(3.4.4),使腐霉利浓度为 0.2 mg/kg,静置 30 min,按 6.2 和 6.3 步骤操作。

6.4.2.2 番茄、黄瓜

称取空白试样 3 g(精确至 0.01 g)置于 50 mL 离心管中,加入 60 μ L 腐霉利标准中间液 B(100 μ g/mL)(3.4.3),使腐霉利浓度为 2 mg/kg,静置 30 min,按 6.2 和 6.3 步骤操作。

6.4.2.3 茄子、葡萄

称取空白试样 3 g(精确至 0.01 g)置于 50 mL 离心管中,加入 30 μ L 腐霉利标准中间液 A(500 μ g/mL)(3.4.2),使腐霉利浓度为 5 mg/kg,静置 30 min,按 6.2 和 6.3 步骤操作。

6.4.2.4 草莓

称取空白试样 3 g(精确至 0.01 g)置于 50 mL 离心管中,加入 60 μ L 腐霉利标准中间液 A

(500 $\mu\text{g/mL}$)(3.4.2),使腐霉利浓度为 10 mg/kg,静置 30 min,按 6.2 和 6.3 步骤操作。

注: 更换快检试剂品牌、批次时,均应进行空白试验和加标质控试验。

7 结果判定

采用目视法对结果进行判读,目视判定示意图如图 1 和图 2 所示。

注: 必要时也可使用胶体金读数仪判读,读数仪的具体操作与判读原则参照读数仪的使用说明书。

7.1 比色法

7.1.1 无效结果

控制线(C 线)不显色,表明操作不正确或试纸条无效。

7.1.2 阳性结果

控制线(C 线)显色,检测线(T 线)不显色或检测线(T 线)颜色比控制线(C 线)颜色浅,表明样品中腐霉利含量高于方法检测限,判定为阳性。

7.1.3 阴性结果

控制线(C 线)显色,检测线(T 线)颜色比控制线(C 线)颜色深或检测线(T 线)颜色与控制线(C 线)颜色相当,表明样品中腐霉利含量低于方法检测限,判定为阴性。

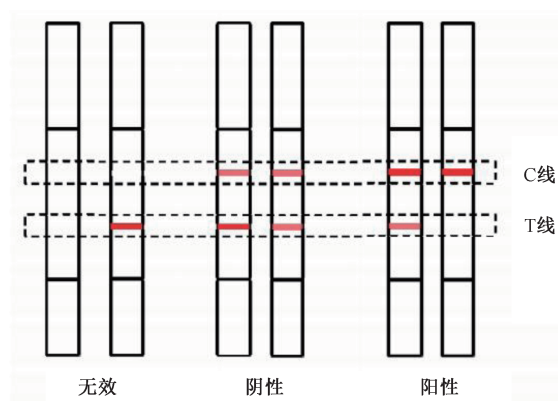


图 1 目视判定示意图(比色法)

7.2 消线法

7.2.1 无效结果

控制线(C 线)不显色,表明不正确操作或试纸条无效。

7.2.2 阳性结果

控制线(C 线)显色,检测线(T 线)不显色,表明样品中腐霉利含量高于方法检测限,判定为阳性。

7.2.3 阴性结果

检测线(T 线)与控制线(C 线)均显色,表明样品中腐霉利含量低于方法检测限,判定为阴性。

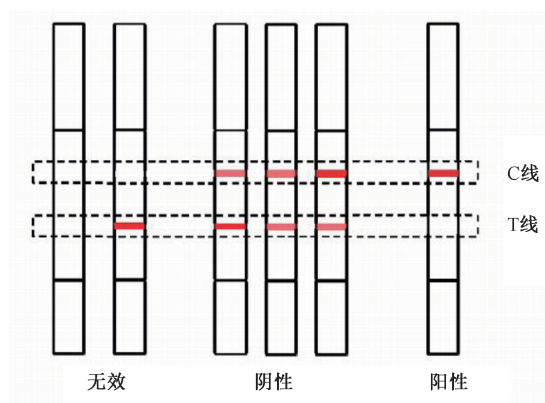


图 2 目视判定示意图(消线法)

7.3 质控试验要求

空白试验测定结果应为阴性,加标质控试验测定结果应为阳性。

8 结论

当测定结果为阳性时,采用参比方法进行确证。

9 性能指标

9.1 性能指标计算按照附录 A 执行。

9.2 检测限:韭菜为 0.2 mg/kg;番茄、黄瓜为 2 mg/kg;茄子、葡萄为 5 mg/kg;草莓为 10 mg/kg。

9.3 灵敏度: $\geq 99\%$ 。

9.4 特异性: $\geq 95\%$ 。

9.5 假阴性率: $\leq 1\%$ 。

9.6 假阳性率: $\leq 5\%$ 。

注:交叉反应率 $< 0.1\%$ 。

10 其他

本方法所述试剂、试剂盒信息、操作步骤及结果判定要求是为给方法使用者提供方便,在使用本方法时不做限定。方法使用者在使用替代试剂、试剂盒或操作步骤前,应对其进行考察,以满足本方法规定的各项性能指标。

本方法参比标准为 GB 23200.113—2018《食品安全国家标准 植物源性食品中 208 种农药及其代谢物残留量的测定 气相色谱-质谱联用法》。

附 录 A
(规范性)
快速检测方法性能指标计算表

性能指标计算方法见表 A.1。

表 A.1 性能指标计算方法

样品情况 ^a	检测结果 ^b		总数
	阳性	阴性	
阳性	N_{11}	N_{12}	$N_{1.}=N_{11}+N_{12}$
阴性	N_{21}	N_{22}	$N_{2.}=N_{21}+N_{22}$
总数	$N_{.1}=N_{11}+N_{21}$	$N_{.2}=N_{12}+N_{22}$	$N=N_{1.}+N_{2.}$ 或 $N_{.1}+N_{.2}$
显著性差异(χ^2)	$\chi^2=(N_{12}-N_{21} -1)^2/(N_{12}+N_{21})$, 自由度(df)=1		
灵敏度($p+$)/%	$p+=N_{11}/N_{1.}\times 100$		
特异性($p-$)/%	$p-=N_{22}/N_{2.}\times 100$		
假阴性率($pf-$)/%	$pf-=N_{12}/N_{1.}\times 100=100-\text{灵敏度}$		
假阳性率($pf+$)/%	$pf+=N_{21}/N_{2.}\times 100=100-\text{特异性}$		
相对准确度 ^c /%	$(N_{11}+N_{22})/(N_{1.}+N_{2.})\times 100$		
注: N 为任何特定单元的结果数,第一个下标指行,第二个下标指列。例如, N_{11} 表示第一行,第一列; $N_{1.}$ 表示所有的第一行, $N_{.2}$ 表示所有的第二列; N_{12} 表示第一行,第二列。			
^a 由参比方法检验得到的结果或者样品中实际的公议值结果。			
^b 由待确认方法检验得到的结果。灵敏度的计算使用确认后的结果。			
^c 为方法的检测结果相对准确性的结果,与一致性分析和浓度检测趋势情况综合评价。			

本方法负责起草单位:山东省食品药品检验研究院。

本方法验证单位:中国检验检疫科学研究院、陕西省食品药品检验研究院、山东师范大学、山东食安检测技术有限公司、济南市历城区综合检验检测中心、厦门海关技术中心。

本方法主要起草人:王骏、泮秋立、胡明燕、梁秀清、刘睿、邢仕歌、林芳。